

UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Master en Biología Molecular, Celular y Genética

Curso Académico 2020 – 2021

Trabajo Fin de Master

Análisis proteómico de líquido sinovial para la búsqueda de
biomarcadores de severidad en la artrosis

Proteomic analysis in synovial liquid to search for severity
biomarkers in Osteoarthritis

Análise proteómica do fluído sinovial para búsqueda de
biomarcadores de gravidade na artrose

Fernando Santoscoy Hernández

Médico Cirujano

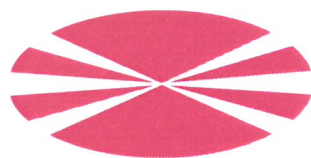
Director

Dr. Francisco J. Blanco García

Co-director

Dra. Patricia Fernández Puente

23 de Julio de 2021



La presente memoria de Trabajo de Fin de Master elaborado por el alumno Fernando Santoscoy Hernández con título:

Análisis proteómico de líquido sinovial para la búsqueda de biomarcadores de severidad en la artrosis

Proteomic analysis in synovial liquid to search for severity biomarkers in Osteoarthritis

Análise proteómica do fluído sinovial para buscar biomarcadores de gravidade na artrose

Ha sido realizado en el área de Proteómica del grupo de Reumatología del INIBIC y en el laboratorio ProteoLab del Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), se encuentra concluido y en condiciones de ser presentado.

A Coruña, a 18 de Junio de 2021

El Director,

Francisco Javier Blanco García

Fdo.:

Co director,

Patricia Fernández Puente

Fdo.:

El alumno,

Fernando Santoscoy Hernández

Fdo.:

Índice

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 4 |
| SUMMARY | 5 |
| RESUMO..... | 6 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 7 |
| 1.1 GENERALIDADES DE LA ARTROSIS | 7 |
| 1.2 EPIDEMIOLOGÍA, ETAPAS Y FACTORES DE RIESGO | 7 |
| 1.3 DIAGNÓSTICO Y PREVENCIÓN | 9 |
| 2. BIOMARCADORES | 11 |
| 2.1 GENERALIDADES..... | 11 |
| 2.2 BIOMARCADORES PROTEICOS | 11 |
| 2.3 BIOMARCADORES EN LOS FLUIDOS CORPORALES..... | 13 |
| 3. PROTEÓMICA | 14 |
| 3.1 PANORAMA Y USO CLÍNICO DE LA PROTEÓMICA | 14 |
| 3.2 TÉCNICAS PROTEÓMICAS BASADAS EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS..... | 15 |
| 3.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS/MS) | 16 |
| 3.4 ANÁLISIS DE LOS DATOS GENERADOS MEDIANTE LC-MS/MS (PEAKS)..... | 17 |
| 4. OBJETIVOS | 19 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 20 |
| 5.1 MUESTRAS DE LÍQUIDO SINOVIAL..... | 20 |
| 5.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE LÍQUIDO SINOVIAL MEDIANTE LC-MS/MS | 21 |
| 5.3 ANÁLISIS DE DATOS MEDIANTE EL PROGRAMA PEAKS..... | 22 |
| 6. RESULTADOS | 24 |
| 7. DISCUSIÓN..... | 29 |
| 8. CONCLUSIÓN..... | 33 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 34 |

Resumen

La osteoartritis (OA) es caracterizada por la degradación progresiva del cartílago articular, cambios en el hueso subcondral acompañados de una alteración en la membrana sinovial; involucra las articulaciones móviles el cual limita la movilidad de ellas. Se reconoce como una enfermedad multifactorial donde distintas causas son capaces de generar y perpetuar el daño sobre el cartílago articular. Una de las limitaciones que presenta el diagnóstico de OA es que se realiza cuando el paciente tiene un daño articular considerable. Como resultado de dicha degradación se liberan fragmentos de estas macromoléculas al líquido sinovial. La determinación de los niveles de estos fragmentos, llamados biomarcadores, podría ser útil con objeto de estandarizar su empleo como procedimiento diagnóstico y pronóstico en la enfermedad degenerativa articular. El uso de biomarcadores como diagnóstico temprano de la enfermedad, sería de gran importancia por su abordaje en la enfermedad antes del comienzo de la sintomatología, evaluación de la progresión y pronóstico. Los biomarcadores se pueden obtener de fluidos corporales en cualquier etapa de la enfermedad para su estudio. Una caracterización molecular detallada del líquido sinovial podría identificar proteínas asociadas con la patogénesis, que se pueden desarrollar como biomarcadores para la evaluación de la enfermedad en etapas tempranas y su progresión. La aplicación de técnicas proteómicas para la búsqueda de nuevos biomarcadores pretende generar información de valor clínico acerca de la susceptibilidad, diagnóstico, pronóstico y terapia. La búsqueda e identificación de los biomarcadores en este trabajo se realiza en base a metodologías proteómicas por medio de espectrometría de masas. Se analizaron 20 muestras de pacientes diagnosticados con OA y un grupo control de líquido sinovial realizando un análisis proteómico utilizando cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución timsTOF Pro para la identificación y cuantificación de proteínas. Para el análisis de los datos se ha usado el software PEAKS. Se han identificado aproximadamente un total de 765 proteínas totales y un total de 585 grupo de proteínas. Se cuantificaron 12 proteínas en las muestras de líquido sinovial comparando los grados de OA con controles sanos utilizando un test de ANOVA ($p < 0.05$). Se han encontrado 3 proteínas las cuales fueron comparadas con estudios previos para analizar su comportamiento como posibles biomarcadores en OA.

Summary

Osteoarthritis (OA) is characterized by the progressive degradation of articular cartilage, changes in the subchondral bone accompanied by an alteration in the synovial membrane; it involves the mobile joints, which limits their mobility. It is recognized as a multifactorial disease where different causes are capable of generating and perpetuating damage to the articular cartilage. One of the limitations with the diagnosis of OA, is that it is performed when the patient has considerable joint damage. The result of the degradation releases fragments of macromolecules to the synovial fluid. The determination of the levels of these fragments, called biomarkers, could be useful in order to standardize their use as a OA diagnostic and prognostic procedure in degenerative joint disease.

The use of biomarkers as an early diagnosis of the disease would be as an important due to its approach to the disease before the onset of symptoms, progression and prognosis. Biomarkers can be obtained for their study from body fluids at any stage of the disease. The application of proteomic techniques to search for new biomarkers aims to generate information of clinical value about susceptibility, diagnosis, prognosis and therapy.

In this study the search and identification of biomarkers is carried based on proteomic methodologies by means of mass spectrometry. 20 samples of synovial fluid from patients diagnosed with OA and a control group were analyzed performing a proteomic analysis using liquid chromatography coupled to a timsTOF Pro high-resolution mass spectrometer for the identification and quantification of proteins. For data analysis, PEAKS software has been used, approximately a total of 765 total proteins and a total of 585 group of proteins have been identified. Twelve proteins were quantified in the synovial fluid samples comparing the degrees of OA with healthy controls using an ANOVA test ($p < 0.05$). Three proteins have been found as possible biomarkers in OA which were compared with previous studies to analyze their role and behavior in the disease.

Resumo

A osteoartróse (OA) está caracterizada pola degradación progresiva da cartilaxe articular, cambios no oso subcondral acompañados dunha alteración na membrana sinovial; involucra as articulacións móbiles, limitando a mobilidade das mesmas. É unha enfermidade multifactorial onde distintas causas son capaces de xerar e perpetuar o dano sobre a cartilaxe articular. Unha das limitacións que presenta a OA co diagnóstico é que realízase cando o paciente ten un dano articular considerable. O resultado de dita degradación é a liberación de fragmentos de macromoléculas ó líquido sinovial. A determinación dos niveis destes fragmentos, chamados biomarcadores, podería ser útil co obxecto de estandarizar o seu emprego como procedemento diagnóstico e pronóstico nesta enfermidade articular.

O uso de biomarcadores como diagnóstico temprá da enfermidade sería de gran importancia pola súa abordaxe na enfermidade, antes do comezo da sintomatoloxía, avaliación da progresión e pronóstico. Os biomarcadores pódense obter dos fluídos corporais en calquera etapa da enfermidade para o seu estudo. A búsqueda e identificación dos biomarcadores neste traballo realizouse en base a metodoloxías proteómicas por medio da espectrometría de masas. A aplicación de técnicas proteómicas para a búsqueda de novos biomarcadores pretende xerar información de valor clínico acerca da susceptibilidade, diagnóstico, pronóstico e terapia.

Neste traballo analizáronse 20 mostras de pacientes diagnosticados con OA e un grupo control de líquido sinovial, realizando unha análise proteómica en cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución timsTOF Pro, para a identificación e cuantificación de proteínas. Para a análise dos datos empregouse o software PEAKS, identificáronse un total de 765 proteínas totais e un total de 585 grupos de proteínas. Cuantificáronse 12 proteínas empregando un test de ANOVA ($p < 0.05$) nas mostras de líquido sinovial comparando os grados de OA con controis sanos. Encontráronse 3 proteínas, as cales foron comparadas con estudos previos para analizar o papel como posibles biomarcadores na OA.

1. Introducción

1.1 Generalidades de la artrosis

La osteoartrosis (OA) es un trastorno que involucra las articulaciones móviles caracterizado por el estrés celular y la degradación de la matriz extracelular iniciada por micro y macro lesiones que activan respuestas de reparación que incluyen vías pro inflamatorias de inmunidad innata. Se caracteriza por una manifestación inicial de trastorno molecular (metabolismo anormal del tejido articular), seguido de un componente anatómico y fisiológico (caracterizado por degeneración del cartílago, remodelación ósea, formación de osteofitos, inflamación articular y pérdida de la función normal de la articulación) que puede terminar en presencia de la enfermedad (V.B. Kraus, 2015).

Además, hasta el día de hoy podemos incluir que existe un patrón génico y proteómico de características inflamatorias similar a lo encontrado en enfermedades tan diversas como la artritis reumatoide o el síndrome metabólico, por lo que actualmente se reconoce el componente inflamatorio como parte fundamental (Rafael Martínez Figueroa, 2015).

1.2 Epidemiología, Etapas y Factores de riesgo

Aproximadamente más del 50% de la población mayor de 65 años presenta algún tipo de osteoartrosis; el cual observamos que la articulación más afectada es la rodilla, con una incidencia de 240/100 000 personas/año (Dr. Armando Ornán Lugo González, 2018).

Una progresión patológica de la osteoartrosis se puede describir generalmente en tres etapas, como se muestra en la figura 1. La etapa I (normal) se caracteriza por la degradación proteolítica de la matriz del cartílago, que resulta de la alteración del metabolismo de los condrocitos que conduce a un aumento de la secreción de enzimas de degradación como colagenasa y agrecanasa. La etapa II (artrosis temprana) implica la fibrilación y erosión de la superficie del cartílago, seguida de la liberación de productos de degradación (proteoglicanos y fragmentos de colágeno) en el líquido sinovial. En la etapa III (artrosis tardía) la inflamación sinovial se produce cuando las células sinoviales fagocitan los productos de degradación, lo que lleva a la producción de citocinas y proteasas inflamatorias. Finalmente, estas moléculas, a su vez, potencian un efecto catabólico sobre el metabolismo de los condrocitos, induciendo proteasas degradativas y disminuyendo la síntesis de proteoglicanos y colágeno y, por tanto, acelerando la progresión de la enfermedad (Lich Thi Nguyen, 2017).

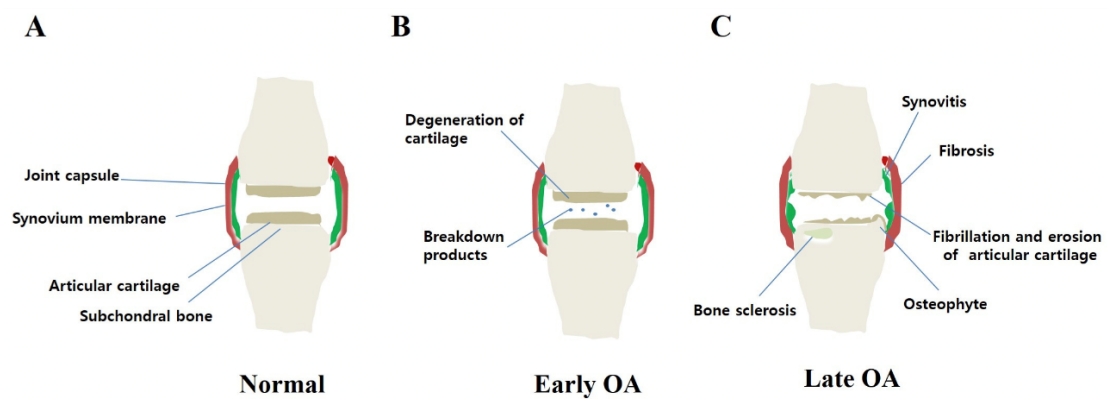


Figura 1. Modelo patológico de la progresión de la Osteoartritis. (A) Articulación normal sin ningún tipo de daño; (B) Osteoartritis temprana caracterizada por la degeneración del cartilago y productos de degeneración en el líquido sinovial; (C) Osteoartritis tardía es un evento con pérdida de cartilago (fibrilación y erosión del cartilago articular) y formación de osteofitos; se puede producir daño al hueso subcondral, la membrana sinovial y la capsula (esclerosis ósea, sinovitis y fibrosis, respectivamente) (Lich Thi Nguyen, 2017)

Además de la presencia de las etapas de la enfermedad, existen clasificaciones radiológicas para determinar en que grado de osteoartrosis se encuentra la articulación afectada. En la clasificación de Kellgren y Lawrence (K&L) se basa en la formación de osteofitos y estrechamiento de espacio articular en rodilla. En la tabla 1 y figura 2 se muestran los grados de OA en que se basa la clasificación K&L (Wainer, 2014).

| | |
|---------|---|
| Grado 0 | Sin cambios |
| Grado 1 | Dudosa disminución espacio articular Aparición de osteofitos |
| Grado 2 | Osteofitos y <i>posible</i> disminución de espacio |
| Grado 3 | Múltiples osteofitos y <i>clara</i> disminución de espacio |
| Grado 4 | Gran cantidad osteofitos, <i>marcada</i> disminución de espacio articular, esclerosis y daño subcondral |

Tabla 1. Clasificación de Kellgren – Lawrence (K&L) de cambios radiológicos de rodilla en OA (Wainer, 2014).

Es fundamental tener estudios radiográficos de buena calidad en proyección anteroposterior, lateral, axial de rotula y de Rosemberg. La proyección de Rosemberg tiene la mejor correlación con la disminución del grosor del cartilago articular (Wainer, 2014).



Figura 2. Evolución de artrosis de rodilla en proyecciones radiográficas según la clasificación de Kellgren – Lawrence (K&L) (Wainer, 2014).

Las alteraciones del peso se han relacionado consistentemente con la OA de rodilla, describiéndose un riesgo mayor en personas con obesidad, así mismo otros factores causantes de la enfermedad son la edad, densidad mineral ósea, sexo y factores nutricionales (Rafael Martínez Figueroa, 2015).

1.3 Diagnóstico y prevención

A nivel histológico la OA, se caracteriza por una degeneración articular progresiva, con inflamación crónica subyacente, junto con presencia de osteofitos, degradación del cartílago, cambios en el hueso subcondral y diversos grados de inflamación sinovial (sinovitis). Aunque la sinovitis se consideró inicialmente un fenómeno tardío del curso de la enfermedad, en la actualidad se ha demostrado y se reconoce como una característica distintiva temprana vinculada al desarrollo del dolor y a la progresión del daño estructural (Laura Tío, 2017).

Independientemente de cual sea la causa original del daño, los fibroblastos de la membrana sinovial responden secretando diversas citoquinas y factores inflamatorios como la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-8 (IL-8), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) entre otras. Estos factores inflamatorios se mantienen presentes en la articulación, independiente del tratamiento corrector de la causa originaria del daño condral pudiendo mantener la progresión del daño articular (Rafael Martínez Figueroa, 2015).

El proceso degenerativo articular que se produce en la artrosis se acompaña de una alteración en el equilibrio normal entre la síntesis y la degradación de las macromoléculas de la matriz

extracelular que confieren al cartílago sus propiedades biomecánicas y funcionales. En el momento en que los pacientes con osteoartritis manifiestan síntomas de la enfermedad, la degradación del cartílago y otras alteraciones articulares han progresado. Por lo tanto, los marcadores específicos para el recambio articular patológico que se pueden detectar antes del desarrollo de los síntomas serían de gran utilidad. Esta es una misión difícil porque la degradación del cartílago no es constante durante la evolución de la enfermedad de la artritis, y se caracteriza por períodos intermitentes de destrucción y remisión progresiva del cartílago. Como resultado de dicha degradación se liberan fragmentos de estas macromoléculas al líquido sinovial, este hecho reside en que la determinación de los niveles de estos fragmentos, llamados biomarcadores, podría ser útil con objeto de estandarizar su empleo como procedimiento diagnóstico y pronóstico en la enfermedad degenerativa articular. La determinación de los niveles de estos marcadores haría posible la graduación de la lesión anatómica articular en la artrosis y la valoración de la respuesta terapéutica a determinados agentes potencialmente condroprotectores (J. C. Acebes-Cachafeiro, 2004).

2. Biomarcadores

2.1 Generalidades

Un marcador biológico o biomarcador es una sustancia que se utiliza como indicador de un estado biológico. Puede medirse y evaluarse objetivamente para controlar los procesos biológicos normales, los procesos patógenos o las respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica.

Idealmente, los marcadores bioquímicos se derivan de los fluidos corporales que están fácilmente disponibles para los investigadores en la fase inicial de una patología, como sangre, suero, orina, líquido sinovial, etc. Para este trabajo usamos muestras de líquido sinovial. Los biomarcadores candidatos también deben tener validez, reproducibilidad un valor predictivo comprobado, y debe haber información sobre cómo se relacionan con los procesos que ocurren en la articulación en los diferentes grados, llegando a un estadio final con consecuencias como el daño estructural, dolor o disfunción y reemplazo articular. Estos biomarcadores permitirían realizar cribados para un diagnóstico precoz, lo que permitiría establecer de antemano los procedimientos dirigidos a ralentizar la progresión de la enfermedad. Además de, facilitar el descubrimiento de nuevos fármacos y el seguimiento de su eficacia proporcionando información sobre su éxito en los ensayos clínicos farmacológicos (Fernandez - Puente P., 2015).

2.2 Biomarcadores proteicos

Los biomarcadores que se pueden obtener de distintos tipos de muestras se pueden clasificar en 6 categorías de acuerdo a parámetros de evaluación y utilidad de los biomarcadores. Estas categorías engloban la carga de la enfermedad (B), investigación (I), pronóstico (P), eficacia (E), diagnóstico (D) y seguridad (s). Esta clasificación conocida como BIPEDs, se propuso para brindar definiciones específicas de biomarcadores con el objetivo de mejorar la capacidad de desarrollar avances dentro de un marco común. Se describen cada una de las categorías de dicha clasificación (Angelo Boffa, 2020):

- **Biomarcadores de carga de enfermedad:** evalúa la gravedad o extensión de la enfermedad, normalmente en un solo momento, entre personas con osteoartritis. Estudios de comparación de estos marcadores con uno o más métodos estándar de

oro para determinar la gravedad de la enfermedad, como criterios clínicos o radiográficos.

- **Biomarcadores de investigación:** si no hay información suficiente para permitir la inclusión en una de las otras categorías se considerara como investigación clasificada.
- **Biomarcadores de pronóstico:** un biomarcador de pronóstico predice el inicio de la osteoartritis en pacientes sin la enfermedad con mala progresión en aquellos con enfermedad existente.
- **Eficacia sobre biomarcadores de intervención:** aquellos que se pueden aplicar en ensayos controlados aleatorios para evaluar los cambios asociados con los tratamientos farmacológicos, estos marcadores pueden ser indicativos o predictivos de la eficacia del tratamiento.
- **Biomarcadores de diagnóstico:** pueden distinguir entre individuos con y sin osteoartritis con buena sensibilidad y especificidad.
- **Biomarcadores de seguridad:** aquellos capaces de reflejar la toxicidad de los tejidos y órganos después de un tratamiento específico, para monitorear los efectos adversos locales y sistémicos tanto tempranos como avanzados, para establecer dosis terapéuticas que no impactan en la fisiología y para comprender cuáles son los rangos seguros para el tejido articular.

Según esta clasificación, un único biomarcador puede cumplir varios criterios para diferentes usos; por tanto, los biomarcadores se han clasificado en una o más categorías (Angelo Boffa, 2020).

Los candidatos a biomarcadores óptimos de osteoartritis son moléculas o fragmentos moleculares presentes en el cartílago, el hueso o la membrana sinovial de la articulación. Hasta la fecha, varias proteínas implicadas directa o indirectamente en la degradación del cartílago, o proteínas sintetizadas en un intento de reparar el cartílago, se han probado en ensayos clínicos para su uso como biomarcadores putativos de OA. Muchas de estas proteínas están asociadas con el metabolismo del colágeno tipo II en el cartílago o el colágeno tipo I en el hueso subcondral, o con el metabolismo del agregano en el cartílago (Cristina Ruiz-Romero P. F.-P., 2016).

En base a lo expuesto anteriormente, queda reflejada la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de diagnóstico temprano para esta enfermedad. Para ello, la aplicación de

tecnologías proteómicas para la búsqueda de nuevos biomarcadores serviría para mejorar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la artrosis (Cristina Ruiz-Romero P. F.-P., 2015)

2.3 Biomarcadores en los fluidos corporales

Se espera que la sangre (el plasma y/o el suero) y otros fluidos corporales sean unos recursos excelentes como fuente de biomarcadores proteicos, ya que están en contacto con la mayor parte de los tejidos, llevando proteínas secretadas por éstos (Dong Zhang, 2007). Una de las mayores ventajas de usar plasma o suero es que son fácilmente obtenibles y que se encuentran en amplias cohortes almacenadas en biobancos. Sin embargo, su desventaja es que las proteínas específicas de los tejidos se pueden encontrar muy diluidas en este tipo de muestras, siendo entonces prácticamente indetectables. Por ello, existe un gran interés en el análisis de los fluidos corporales “proximales”, que contactan con sólo uno o unos pocos tejidos, por lo que las proteínas específicas estarían menos diluidas.

Dado que la OA involucra el cartílago articular, el hueso y la membrana sinovial circundante, es mas probable buscar mediadores de procesos inflamatorios y degradativas, así como las moléculas fragmentadas resultantes como biomarcadores candidatos de la enfermedad (Shalini M. Mahendran, 2017). Las alteraciones en el metabolismo de cualquiera de estos tejidos durante la progresión de la enfermedad se reflejan como alteraciones en el perfil proteómico del líquido, que también esta menos influenciado por condiciones sistemáticas.

Una caracterización molecular detallada del líquido sinovial podría identificar proteínas asociadas con la patogénesis, que se pueden desarrollar como marcadores para la evaluación de la enfermedad en etapas tempranas y su progresión (Lavanya Balakrishnan, 2014), además la evaluación del proteoma del líquido sinovial produce una mayor concentración de biomarcadores potenciales que el suero y la orina, ya que está en contacto directo con la zona afectada.

3. Proteómica

3.1 Panorama y uso clínico de la proteómica

La síntesis de todas las proteínas celulares esta codificada por los genomas; en la actualidad la proteómica es la nueva etapa en la investigación biológica que emana naturalmente de la genómica e incluye la caracterización de la expresión de las proteínas codificadas por un genoma el establecimiento de sus propiedades funcionales y estructurales (Tobías Mojica Ph.D., 2003).

Las diversas propiedades de las proteínas pueden proveer modificaciones, cantidad, secuencia e interacciones con otras proteínas tanto en un estado sano y patológico. Algunas de las actividades que realiza la proteómica clínica son:

- a) Búsqueda e identificación de biomarcadores individuales siguiendo la metodología proteómica clásica de separación de proteínas e identificación por espectrometría de masas.
- b) Estudio sistemático a gran escala para la identificación de patrones o perfiles proteicos, con carácter diagnóstico.
- c) Utilización de herramientas bioinformáticas para el almacenamiento y procesamiento de los datos masivos generados por proteómica, con la finalidad de aplicación de métodos de jerarquización, visualización de datos, algoritmos estadísticos multivariantes, para definir los perfiles específicos de las distintas patologías.

La aplicación clínica de la proteómica implica el uso de las tecnologías proteómicas para todos aquellos aspectos que puedan beneficiar a los pacientes, desde la búsqueda de nuevos marcadores de enfermedad o de perfiles proteicos diagnósticos, hasta la descripción de factores predictivos y preventivos que permitan un tratamiento y seguimiento terapéutico personalizado. Estas técnicas pretenden definir patrones de proteínas que puedan generar información de valor clínico acerca de la susceptibilidad, diagnóstico, pronóstico y terapia de la enfermedad. Testar hipótesis clínicas relevantes, frente a conjuntos de datos derivados de medidas procedentes de técnicas de alto rendimiento, como las proteómicas y poblaciones humanas fenotipadas correctamente, es función esencial de la proteómica clínica (Vivanco, 2006).

3.2 Técnicas proteómicas basadas en espectrometría de masas

El esquema básico de trabajo en las técnicas de proteómica basadas en espectrometría de masas se fundamenta en la separación de proteínas o péptidos para su posterior identificación y, en determinados casos, su cuantificación (absoluta o relativa) entre las diferentes condiciones de estudio. La separación de proteínas es un paso crítico en proteómica, y los métodos más utilizados pueden dividirse en dos grupos: métodos basados en gel y métodos basados en cromatografía, la más utilizada es la cromatografía en fase líquida.

La electroforesis bidimensional (2-DE) es una técnica basada en gel que se basa en la realización de dos separaciones: la primera en función de la carga de las proteínas, y la segunda en función de su masa molecular. Alternativamente, se puede realizar una única separación en gel, electroforesis monodimensional (1-DE), solo en función de la masa molecular.

La cromatografía líquida es un método no basado en gel cuyo fundamento es que un líquido (fase móvil) circule en contacto con un sólido (columna) u otro líquido inmiscible (fase estacionaria). Cuando las muestras o analitos son introducidos en la corriente de la fase móvil, cada uno de ellos avanzará a lo largo del sistema con una velocidad determinada en función de su afinidad por cada fase. Esto implica que, una vez finalizado el recorrido de la muestra en la columna, cada analito eluye con un tiempo diferente produciéndose su separación.

La identificación de proteínas y péptidos una vez separadas se lleva a cabo mediante espectrometría de masas. Los espectrómetros de masas constan de cuatro componentes fundamentales:

- Fuente de ionización: donde se forman los iones. Puede ser de dos tipos, ionización en fase sólida MALDI (matrix assisted laser ionization) o en fase líquida (electrospray, ESI)
- Analizador de masas: analiza los iones según su relación masa/carga (m/z). Hay varios tipos, sencillos (un solo analizador de masas (MS): TOF (time of flight, tiempo de vuelo), Q (cuadrupolo) o trampa de iones (IT)
- Espectrómetros de masa en tándem (MS/MS): combinación de varios analizadores en el tiempo (Q-TOF), que permiten fragmentar los péptidos en sus correspondientes iones y obtener secuencias peptídicas
- Detector (Fotomultiplicadores)
- Sistema de adquisición y tratamiento de los datos.

3.3 Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS/MS)

Para realizar este trabajo se ha utilizado un sistema de nano-cromatografía líquida nanoElute (Bruker) (Figura 3) acoplado a un espectrómetro de masas timsTOF Pro de alta resolución. El analizador de masas consta de un cuadrupolo de alta resolución tipo Q-TOF (analizador en configuración híbrida cuadrupolo y tiempo de vuelo), con trampa de movilidad iónica TIMS (trapped ion mobility) con tecnología PASEF (Parallel Accumulation Serial Fragmentation).



Figura 3. Sistema de nano-cromatografía líquida, nanoElute.

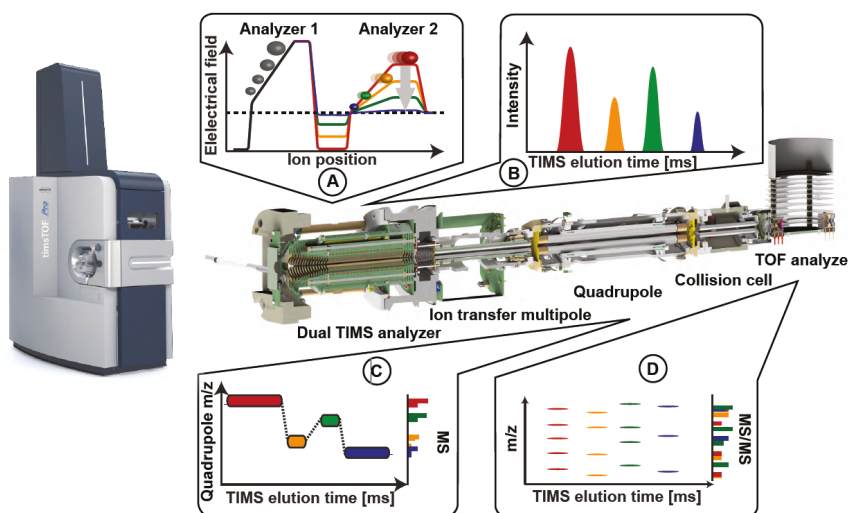


Figura 4. Espectrómetro de masas timsTOF Pro.

El analizador TIMS permite la separación de los iones mediante su movilidad iónica, así proporciona al sistema timsTOF Pro (figura 4) una excelente selectividad a la hora de aislar y fragmentar iones precursores, puesto que la movilidad iónica permite separar péptidos muy próximos en masa e incluso isobáricos. Además, el sistema presenta una sensibilidad extrema

al acumular en la trampa de iones péptidos que presentan una intensidad muy baja de manera que se puedan detectar y fragmentar. En la trampa de movilidad iónica (TIMS), los iones precursores se acumulan en paralelo y se liberan secuencialmente en función de la movilidad iónica. La tecnología PASEF asociada al TIMS sincroniza automáticamente, en sub-milisegundos, la radiofrecuencia del cuadrupolo para aislar cada uno de los valores de m/z (masa/carga) de los precursores seleccionados que se liberan del TIMS para fragmentarlos posteriormente: Así pues, la tecnología PASEF asociada al analizador TIMS permite analizar péptidos y proteínas con máxima sensibilidad, rendimiento y reproducibilidad.

3.4 Análisis de los datos generados mediante LC-MS/MS (PEAKS)

Los datos adquiridos mediante PASEF con el timsTOF Pro serán procesados mediante un software llamado PEAKS Studio. PEAKS se encarga de cada paso del análisis, de la conversión de datos, identificación de péptidos y proteínas, modificaciones postraduccionales de proteínas (PTMs) y la caracterización de las mutaciones, así como la visualización de los resultados mediante informes (figura 5). El software combina cuatro algoritmos complementarios, mejorando la sensibilidad en la identificación y cuantificación de proteínas y péptidos (team, 2017).

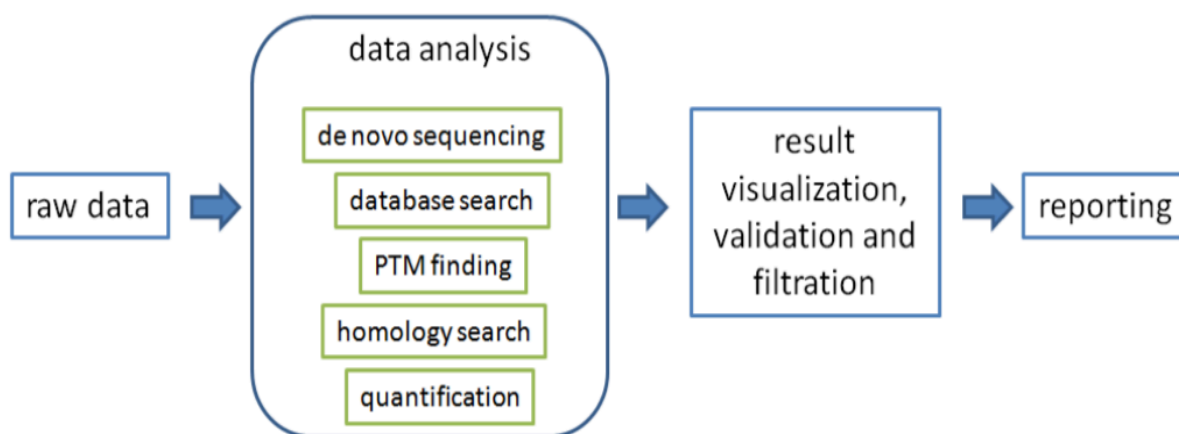


Figura 5. Flujo de trabajo realizado por el software PEAKS en cada paso del análisis de datos crudos adquiridos del espectrómetro de masas timsTOF Pro.

En el interfaz de usuario se muestra la información relativa a las proteínas identificadas, la cobertura de la identificación de las mismas. También se muestra el listado de péptidos identificados indicando el error de masa y las modificaciones postraduccionales encontradas,

la secuencia de los péptidos analizados, su espectro de MS/MS y su abundancia a nivel de masas (MS1).

PEAKS Studio también incluye un módulo para cuantificar la abundancia relativa de proteínas basada en los cambios en diferentes muestras simultáneamente, el módulo de cuantificación soporta métodos de "Label Free Quantification" (marcaje libre), TMT (etiqueta de masa en tándem), iTRAQ (etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta) y SILAC (etiquetado de isótopos estables por aminoácidos en cultivo celular). La interfaz del módulo de cuantificación permite visualizar la comparación entre grupo de muestras mediante diferentes gráficos (vulcano y mapa de color). El listado de proteínas permite comparar fácilmente la expresión de cada una de las proteínas entre las diferentes muestras que conforman un grupo, tanto por un código de colores como por su expresión (ratio). Para realizar la cuantificación el software realiza un alineamiento y comparación de intensidades de los iones detectados en las diferentes muestras a nivel de masas (MS1) mediante un algoritmo que permite minimizar la variación debida a péptidos que no estén presentes en alguna de las muestras. Además, selecciona los tres péptidos más abundantes para la estimación de los ratios, descartando los péptidos redundantes y aquellos que presentes diferentes modificaciones. La cuantificación puede realizarse mediante diferentes aproximaciones estadísticas como t-test o Anova, dependiendo del análisis que se quiera realizar.

4. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo ha sido identificar y cuantificar posibles biomarcadores proteicos presentes en muestras de líquido sinovial en diferentes grados de artrosis (OA) comparados con donantes control mediante técnicas proteómicas basadas en la espectrometría de masas. Para poder llevar a cabo este objetivo se plantea:

- Metodología necesaria para llevar a cabo el análisis de los líquidos sinoviales, usando la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
- Análisis de los datos obtenidos mediante el software PEAKS
- Identificación y cuantificación de posibles biomarcadores en los distintos grados de artrosis

5. Materiales y Métodos

5.1 Muestras de líquido sinovial

Se consideraron candidatos a la inclusión de este experimento muestras de líquido sinovial de pacientes con artrosis (OA) y donantes control sin OA post mortem. Las muestras (n=20) incluyen un grupo control considerado como grado 0 de la enfermedad y los grupos patológicos o que presentaban la enfermedad considerándolos en grado I, grado II, grado III y grado IV con respecto al desgaste articular y diagnosticados previamente siguiendo la clasificación de Kellgren y Lawrence (K&L) (Wainer, 2014). El rango de edades de las personas donantes es entre 24 – 90 años, la mayoría de las muestras corresponden a mujeres, 55% (11 muestras) frente a un 45% de hombres (9 muestras). La distribución de las 4 muestras por grupo, fue el género, edad y grado de la enfermedad de los donantes. El grado 0 o grupo control (G0) comprende un rango de edad entre 24 –50 años, grado I entre 44 – 64 años, grado II entre 51 – 64 años, grado III 48 – 66 años y grado IV entre 52 – 90 años (tabla 2).

| Muestras n= 20 | Grado de OA | Género | Muestras (%) | Edad (media ± std) |
|---|-------------|-----------|--------------|-----------------------|
| Femenino 11 (55%) Masculino 9 (45%) Edad 24-90 años. (57 ± 33) | Grado 0 | Masculino | 3 (75%) | (37 ± 13) años |
| | | Femenino | 1 (25%) | |
| | Grado I | Masculino | 1 (25%) | (54 ± 10) años |
| | | Femenino | 3 (75%) | |
| | Grado II | Masculino | 2 (50%) | (57.5 ± 6.5) años |
| | | Femenino | 2 (50%) | |
| | Grado III | Masculino | 2 (50%) | (57 ± 9) años |
| | | Femenino | 2 (50%) | |
| | Grado IV | Masculino | 0 (0%) | (71 ± 19) años |
| | | Femenino | 4 (100%) | |

Tabla 2. Muestras de líquido sinovial utilizadas. Número total de muestras (n), clasificadas por grado de OA, género y edad (media ± std).

Las muestras de líquido sinovial (LS) se centrifugaron a (1000 x g), se recogió el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteínas a 580nm en utilizando el instrumento nanoDROP. (Jesús Mateos, 2012). Para la digestión en solución de las proteínas a péptidos se utilizaron 10 µg de proteínas de LS. Se disolvieron en un tampón desnaturizante y reductor (6 M Urea/2

M Thiourea, 25 mM ammonium bicarbonate, 10 mM Dithiothreitol (DTT)) durante 1 hora a 37 °C. Las cisteínas se alquilan con 50 mM de Iodoacetamida durante 45 min en la oscuridad. Las muestras fueron diluidas en 25 mM de bicarbonato de amonio hasta obtener una concentración final de 1M de urea y se le agregó las enzimas LysC y tripsina (Promega) en una proporción de 1:25 (enzima: proteína) durante 16 horas a 37 °C. Los péptidos resultantes de la digestión de las proteínas se acidificaron con trifluoroacético (TFA) y se limpiaron mediante columnas C18 (3M Empore SPE-C18 disk, 47 mm, Sigma Aldrich) para eliminar sales y posibles contaminantes que puedan interferir en los análisis de espectrometría de masas. Las muestras limpias se secaron mediante una centrifuga de vacío (Thermo, USA). Las muestras secas se reconstituyeron en fase móvil A (0.1% ácido fórmico (FA) en agua) para ser inyectadas en el sistema de nano-cromatografía líquida acoplado a la espectrometría de masas (LC-MS/MS). El flujo de trabajo seguido para la preparación de las muestras de líquido sinovial se muestra en la figura 6.

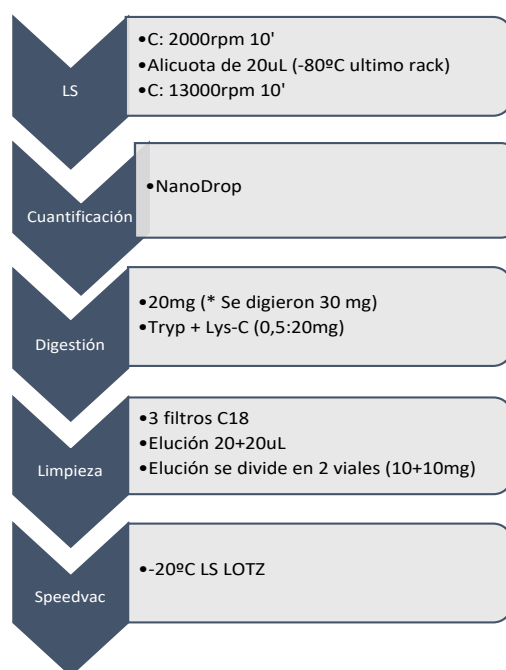


Figura 6. Flujo de trabajo seguido para la preparación de las muestras de líquido sinovial

5.2 Análisis de muestras de líquido sinovial mediante LC-MS/MS

La mezcla de péptidos (200ng) fue cargada en un sistema de nanoLC, (nanoElute Bruker Daltonics) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (timsTOF Pro, Bruker Daltonics) con una fuente de iones Captive Spray (Bruker Daltonics). La separación de los

péptidos en el nanoLC se realizó a 50 °C con un flujo constante de 500 nL/min en una columna de fase reversa C18 (15 cm * 75 µm i.d.), con una punta emisora (emitter), empaquetada con perlas de sílice porosas recubiertas con C18 de 1.9µm (Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen, Germany). Se utilizó un gradiente lineal al 5-30% de tampón B (100% acetonitrilo (ACN) and 0.1% FA) durante 60 min como se indica en la tabla 3.

| Tiempo (min) | %B |
|--------------|----|
| 0 | 2 |
| 60 | 35 |
| 62 | 95 |
| 70 | 95 |

Tabla 3. Gradiente cromatográfico utilizado en el sistema nanoLC

Se inyectaron dos replicas técnicas de cada líquido sinovial y se inyectaron 3 blancos entre cada una de las muestras, para evitar posibles contaminaciones de muestra a muestra. Los datos de LC-MS/MS se adquirieron en el espectrómetro de masas utilizando el método PASEF con un tiempo de ciclo total de 1.1 segundos. Los espectros de MS y MS/MS se registraron desde una relación de masa/carga (m/z) 100 a 1700.

5.3 Análisis de datos mediante el programa PEAKS

Los archivos crudos procedentes del espectrómetro de masas se procesaron con el programa PEAKS studio 10.6 build 20201221 (Bioinformatics solutions Inc.). Todas las búsquedas fueron realizadas utilizando la base de datos UniprotKB 2021_02_20383_human entries. Los criterios de búsqueda fueron los siguientes, Tryp-LysC como enzimas, la carbamidometilación de los residuos de la cisteína se estableció como una modificación fija y la oxidación de la metionina, acetilación de la proteína N-terminal y la desamidación de NQ se establecieron como variables modificadas. La tolerancia máxima de masa inicial fue de 15 ppm para los iones precursores y 0.02 Da para los iones fragmentados. Se empleó una biblioteca de secuencias reversa para controlar la tasa de falsos positivos (FDR) a menos del 1% para las coincidencias del espectro de los péptidos y la identificación de los grupos de proteínas. La cuantificación de las proteínas se realizó mediante la opción de marcaje libre en el software con las siguientes condiciones, el error de masa se estableció en 20 ppm, una tolerancia en el tiempo de retención de los péptidos de 6 min, y de movilidad iónica de 0.05. Las muestras fueron normalizadas

usando la señal del cromatograma de todos los iones (TIC) de cada una de las muestras/ TIC de una muestra de referencia que es automáticamente seleccionada por el software. La cuantificación del nivel de abundancia de proteínas se calculó utilizando el área de la suma de los tres péptidos únicos con mayor intensidad. Las proteínas cuantificadas deben de tener más de dos péptidos y un ratio (fold change) ≥ 1.5 , entre las diferentes condiciones del análisis. Se utilizó un false discovery rate (FDR) $\leq 1\%$ y los datos se analizaron mediante el test de la varianza (ANOVA) (p-value <0.05).

6. Resultados

Los resultados obtenidos mediante el análisis de las muestras por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) se describen a continuación. Se identificaron aproximadamente un total de 585 grupos de proteínas y 765 proteínas totales en las muestras de líquido sinovial. En la tabla 4 se muestran la cantidad de péptidos, proteínas y grupos de proteínas (proteínas que comparten dos o mas péptidos) identificados en el grupo control (pacientes que no presentan datos de OA) y en cada grado de la enfermedad (grado I, II, III y IV). Las proteínas identificadas en cada una de las muestras de los pacientes han sido diferentes, ya que las muestras corresponden a distintos grados de la enfermedad, ambos sexos y diferentes grupos de edad. Por lo cual, en cada muestra podemos obtener valores diferentes incluso cuando estemos hablando del mismo grado de la OA. Además, se ha analizado una réplica técnica de cada muestra y se han obtenido prácticamente el mismo número de total de proteínas identificadas (CV <5%), con lo que se demuestra la reproducibilidad del sistema LC-MS/MS.

a)

| Muestra | # Péptidos | # Proteínas | | CV (%) |
|-------------|------------|-------------|---------|--------|
| | | Grupos | Totales | |
| 1 Grado 0 | 6492 | 653 | 794 | 0.501 |
| 1 Grado 0_R | 6522 | 671 | 802 | |
| 2 Grado 0 | 6891 | 763 | 1001 | 0.754 |
| 2 Grado 0_R | 6900 | 769 | 986 | |
| 3 Grado 0 | 7360 | 778 | 995 | 0.201 |
| 3 Grado 0_R | 7275 | 770 | 991 | |
| 4 Grado 0 | 5318 | 543 | 643 | 1.180 |
| 4 Grado 0_R | 5280 | 524 | 628 | |

b)

| Muestra | # Péptidos | # Proteínas | | CV (%) |
|-------------|------------|-------------|---------|--------|
| | | Grupos | Totales | |
| 5 Grado I | 5042 | 707 | 942 | 1.977 |
| 5 Grado I_R | 6269 | 755 | 980 | |
| 6 Grado I | 6889 | 712 | 892 | 3.201 |
| 6 Grado I_R | 6939 | 738 | 951 | |
| 7 Grado I | 6088 | 537 | 669 | 0.149 |
| 7 Grado I_R | 6057 | 538 | 671 | |
| 8 Grado I | 4728 | 548 | 717 | 0.623 |
| 8 Grado I_R | 4741 | 552 | 726 | |

c)

| Muestra | # Péptidos | # Proteínas | | CV (%) |
|---------------|------------|-------------|---------|--------|
| | | Grupos | Totales | |
| 9 Grado II | 5074 | 473 | 595 | 1.896 |
| 9 Grado II_R | 5201 | 491 | 618 | |
| 10 Grado II | 6193 | 592 | 768 | 0.839 |
| 10 Grado II_R | 6357 | 604 | 781 | |
| 11 Grado II | 4828 | 436 | 549 | 0.902 |
| 11 Grado II_R | 4832 | 441 | 559 | |
| 12 Grado II | 4871 | 557 | 784 | 0.063 |
| 12 Grado II_R | 4988 | 568 | 785 | |

d)

| Muestra | # Péptidos | # Proteínas | | CV (%) |
|----------------|------------|-------------|---------|--------|
| | | Grupos | Totales | |
| 13 Grado III | 7771 | 920 | 1219 | 0.910 |
| 13 Grado III_R | 7757 | 915 | 1197 | |
| 14 Grado III | 6072 | 714 | 942 | 0.737 |
| 14 Grado III_R | 6116 | 724 | 956 | |
| 15 Grado III | 5184 | 470 | 616 | 0.489 |
| 15 Grado III_R | 5043 | 469 | 610 | |
| 16 Grado III | 4636 | 445 | 546 | 1.298 |
| 16 Grado III_R | 4596 | 434 | 532 | |

e)

| Muestra | # Péptidos | # Proteínas | | CV (%) |
|---------------|------------|-------------|---------|--------|
| | | Grupos | Totales | |
| 17 Grado IV | 5501 | 637 | 821 | 0.121 |
| 17 Grado IV_R | 5456 | 636 | 819 | |
| 18 Grado IV | 4865 | 540 | 697 | 0.868 |
| 18 Grado IV_R | 4790 | 523 | 685 | |
| 19 Grado IV | 4494 | 465 | 572 | 0.262 |
| 19 Grado IV_R | 4442 | 467 | 569 | |
| 20 Grado IV | 4648 | 416 | 495 | 1.590 |
| 20 Grado IV_R | 4888 | 429 | 511 | |

Tabla 4. Péptidos, grupos de proteínas y proteínas totales identificadas en muestras de líquido sinovial con diagnóstico de OA y donantes control mediante LC-MS/MS. Se analizaron 20 muestras, 4 muestras y sus replicas por cada grupo a) grupo control o grado 0, b) grado I OA, c) grado II OA, d) grado III OA y e) grado IV OA.

R: replica de cada muestra, CV: coeficiente de variación (%) de las proteínas totales identificadas en cada una de las muestras y sus replicas.

Además de identificar las proteínas en el grupo control y en los distintos grados de la enfermedad, el software PEAKS permite realizar una cuantificación relativa por marcaje libre de las proteínas entre las diferentes condiciones. En este caso la cuantificación de las proteínas se ha hecho de los diferentes grados de OA en líquidos sinoviales (LS) frente a las muestras control. En la figura 7, se muestra un mapa de calor (heat map) en el cual podemos observar la diferencia de expresión de 12 proteínas cuantificadas. Estas proteínas cuantificadas se obtuvieron aplicando un test de ANOVA y un FDR <1% y los parámetros especificados en el apartado 4.3.

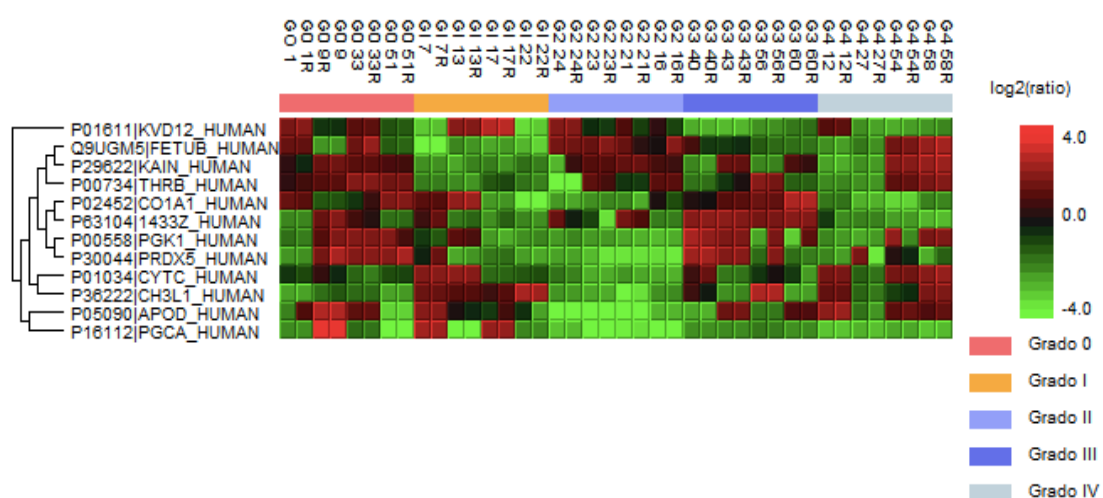


Figura 7. Perfil proteico representado mediante un mapa de calor (heat map). El color representa el log2(ratio) del promedio de su cantidad en diferentes muestras de líquido sinovial con diferentes grados de OA y el grupo control.

El comportamiento de estas proteínas se expresa en una escala de medición de color, verde se encuentra disminuida y roja aumentada. Las proteínas cuantificadas se describen en la tabla 5.

| Número de acceso | Gen | Proteína |
|------------------|-----------|-------------------------------------|
| P63104 | YWHAZ | 14-3-3 protein zeta/delta |
| P29622 | SERPINA4 | Kallistatin |
| P16112 | ACAN | Aggrecan core protein |
| P30044 | PRDX5 | Peroxiredoxin-5 mitochondrial |
| P01034 | CST3 | Cystatin-C |
| Q9UGM5 | FETUB | Fetuin-B |
| P01611 | IGKV1D-12 | Immunoglobulin kappa variable 1D-12 |
| A0A0C4DH73 | IGKV1-12 | Immunoglobulin kappa variable 1-12 |
| P00734 | F2 | Prothrombin |
| P36222 | CHI3L1 | Chitinase-3-like protein 1 |
| P05090 | APOD | Apolipoprotein D |
| P00558 | PGK1 | Phosphoglycerate kinase 1 |
| P02452 | COL1A1 | Collagen alpha-1(I) chain |

Tabla 5. Proteínas cuantificadas en las muestras de pacientes control (Grado 0) y con diagnóstico de OA (Grado I – IV) utilizando un test de ANOVA ($p < 0.05$) mediante el software PEAKS.

En la tabla 6 se describe el ratio de cada proteína comparando su expresión en cada uno de los grados con respecto al grupo control (grado 0) al que el software le asigna el valor 1 como valor de referencia.

Las proteínas Fetuin-B, Immunoglobulin kappa variable 1D-12 y 14-3-3 protein zeta/delta tuvieron comportamientos fluctuantes ya que en etapas tempranas se encontraban disminuidas o aumentadas al igual que en etapas tardías. De igual manera las proteínas Apolipoprotein D, Phosphoglycerate kinase 1, Prothrombin expresaron una tendencia a estar aumentadas o disminuidas en su expresión en pacientes con OA respecto al grupo control. Por lo que estas proteínas no tienen una tendencia constante ni una modulación significativa en el proceso artrosico.

| Description | G0 | G1 | GII | GIII | GIV |
|---|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 14-3-3 protein zeta/delta | 1 | 0.77 | 0.95 | 1.96 | 0.49 |
| Kallistatin | 1 | 0.42 | 0.91 | 0.74 | 1.05 |
| Aggrecan core protein | 1 | 0.49 | 0.05 | 0.17 | 0.09 |
| Peroxiredoxin-5 mitochondrial (PRDX 5) | 1 | 0.39 | 0.13 | 0.94 | 0.43 |
| Cystatin-C | 1 | 1.56 | 0.45 | 1.01 | 1.74 |
| Fetuin-B | 1 | 0.29 | 1.37 | 0.65 | 0.92 |
| Immunoglobulin kappa variable 1D-12 | 1 | 1.32 | 1 | 0.33 | 0.51 |
| Prothrombin | 1 | 0.45 | 0.67 | 0.71 | 0.71 |
| Chitinase-3-like protein 1 | 1 | 3.13 | 0.66 | 2.39 | 2.21 |
| Apolipoprotein D | 1 | 0.78 | 0.06 | 0.61 | 0.92 |
| Phosphoglycerate kinase 1 | 1 | 0.53 | 0.28 | 1.13 | 0.78 |
| Collagen alpha-1(I) chain | 1 | 0.83 | 0.49 | 1.48 | 0.34 |

Tabla 6. Ratio de las proteínas cuantificadas. Se expresan los ratios de las proteínas en cada grado de la enfermedad (G I – G IV) y se comparan con el grado 0 o grupo control como el valor basal (1). Las proteínas con un comportamiento de aumento (ratio ≥ 1.5) o disminución (ratio ≤ 0.5) en su modulación con respecto al grupo control, fueron seleccionadas (texto sombreado) en este trabajo como posibles biomarcadores.

Las proteínas consideradas en este trabajo como posibles biomarcadores, fueron aquellas que cumplieron que la proteína estuviera aumentada con respecto al grupo control (ratio ≥ 1.5) o disminuida (ratio ≤ 0.5) en cada condición de OA. Se consideran como posibles biomarcadores en este trabajo aquellas proteínas que presentaron una disminución en su expresión como el agrecano (Aggrecan core protein), la PRDX 5 (Peroxiredoxina-5 mitocondrial) y el colágeno alfa 1 (collagen alpha-1) y las que presentaron un aumento en su expresión como la cistatina C (CysC) y la quitinasa (chitinase 3-like protein 1).

7. Discusión

Los biomarcadores tienen una aplicación generalizada en la práctica clínica en la que proporcionan parámetros objetivos que sirven como sustituto de los estados biológicos, pueden usarse para abordar el riesgo de presentar una enfermedad, el diagnóstico, el pronóstico, como el grado de respuesta a un compuesto terapéutico. Están constituidos por proteínas que se desencadenan en los procesos fisiopatológicos de ciertas enfermedades (I. Torres Courchoud, 2016). En este trabajo, las proteínas obtenidas en muestras de líquido sinovial que se consideran como posibles biomarcadores son los que han presentado una alteración en su expresión (tabla 6) en los distintos grados de la OA en comparación con el grupo control encontrados por proteómica utilizando la espectrometría de masas como técnica de análisis. El número de biomarcadores que se investigan actualmente aumenta rápidamente con la expansión de la proteómica, los cambios metabólicos de los tejidos articulares comienzan mucho antes del inicio de las alteraciones estructurales.

Dentro de las proteínas que presentan una disminución en su expresión encontramos el agrecano (Aggrecan core protein), que es el principal proteoglicano del cartílago articular, ya que proporciona una estructura de gel hidratado (a través de su interacción con ácido hialurónico y una proteína de enlace) que conlleva al cartílago a tener propiedades de soporte de carga. Su correcto funcionamiento es crucial en el desarrollo de la morfogénesis esquelética ya que es una molécula expresada por los condrocitos (Chris Kiani, 2002). Los resultados de una baja expresión del agrecano, probablemente reflejan la pérdida de la matriz extracelular ósea. La pérdida de agrecano se debe a la inflamación o sobrecarga articular, una vez iniciado el daño, el cartílago articular tiene poca capacidad para la reparación endógena y aparece un daño mayor inevitable (Mort, 2014). Los resultados obtenidos en este trabajo y los datos existentes en la literatura están relacionados y coinciden que una disminución en su expresión esta relacionada con la OA.

La proteína PRDX 5 (Peroxiredoxin-5 mitochondrial) es una tiorredoxina reductasa que reduce el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los hidroperóxidos de alquilo y el peroxinitrito. Se diferencia de las otras peroxiredoxinas por su mecanismo enzimático, su alta afinidad por los peróxidos orgánicos y peroxinitrito y su amplia distribución subcelular, ya que confiere una citoprotección notable frente al estrés oxidativo a las células de los mamíferos (Stephanie De

Simoni, 2013) (Geoffroy Walbrecq, 2015). Se expresa ampliamente en los tejidos, pero se diferencia por su distribución subcelular de mayor tamaño. Se ha demostrado que en las células humanas puede dirigirse a las mitocondrias, peroxisomas, al citosol y al núcleo. Se considera como una enzima antioxidante cito protectora que actúa contra los ataques de peróxido endógenos o exógenos mas que como un sensor redox. En consecuencia, la sobreexpresión de la enzima puede proteger a la célula contra la muerte causada por estrés nitro oxidativo, mientras que el silenciamiento de genes las hace más vulnerables (Bernard Knoops, 2011). La PRDX5 presenta una disminución en su expresión en los resultados obtenidos, por lo que esta estrechamente relacionada con la presencia de OA descrita en la literatura ya que, en valores aumentados, esta proteína funciona de manera protectora.

El colágeno alfa 1 (collagen alpha-1) presenta una disminución en su expresión, este tipo de colágeno es una de las principales proteínas de la matriz extracelular del cartílago que es esencial para el correcto funcionamiento del cartílago y su degradación contribuye al desgaste del cartílago. Algunos estudios indican que los genes condrogénicos del colágeno alfa 1 están notablemente infra regulados en condrocitos aislados de ratones con OA en comparación con los condrocitos aislados de ratones normales (Yubao Liu, 2018). El cartílago en la OA puede experimentar un proceso de cambio degenerativo crónico agravado por cambios fenotípicos asociados con la diferenciación de condrocitos. El daño al colágeno, su perdida junto con el agrecano y la calcificación de la matriz, crean una mala alternativa al cartílago que normalmente se encuentra resistente en los sujetos sin artrosis. Es en estas condiciones en particular, que la carga mecánica traumatiza y daña directamente el cartílago, conlleva a una perdida neta del cartílago. Mientras que los fragmentos de fibronectina de diferentes regiones de la molécula pueden inducir tanto la degradación de colágeno como de agrecano, un fragmento de colágeno tipo II de la región helicoidal de la fibronectina solo puede inducir la actividad colagenasa, así como de algunas citoquinas (A R Poole, 2002). La disminución de la expresión del colágeno conduce a un cambio degenerativo, por lo que existe una relación con los resultados obtenidos e investigaciones previas que cumplen con el mismo comportamiento desde los primeros grados de la OA.

Dentro de las proteínas que presentan un aumento en su expresión, encontramos a la proteína 1 similar a la quitinasa (CHI3L1) que tiene un comportamiento de aumento en su modulación desde el primer grado de la enfermedad. La CHI3L1 es una de las 18 glicosil hidrolasas de la

familia conservadora de las quitinasas de mamíferos. Se sabe que juega un papel importante en la inflamación, proliferación y angiogénesis (Joanna Salomon, 2017). Es producida por una multitud de células, incluidos macrófagos, neutrófilos, células similares a fibroblastos, células hepáticas, células endoteliales y células cancerosas. Conduce a la protección contra patógenos, respuestas a lesiones inducidas por antígenos y oxidantes, inflamación y reparación y remodelación tisular mediante la regulación de una variedad de procesos biológicos esenciales que incluyen daño oxidante, apoptosis, activación del inflamasoma, diferenciación de macrófagos, acumulación de células dendríticas, regulación de la matriz extracelular y cicatrización parenquimatosas. Se expresa en el cartílago y osteofito osteoartrotico humano enfermo y se encuentra que induce artritis acompañada de cambios patológicos en hueso y cartílago, es un factor derivado del cartílago asociado con mediadores de la inflamación y destrucción del cartílago implicados en la patogenia de la OA. La CHI3L1 en el líquido sinovial influye a nivel sanguíneo y ambos están involucrados en la fisiopatología de los procesos artríticos y reflejan la actividad de la enfermedad local (Ting Zhao, 2020). Se ha sugerido que CHI3L1 puede ser uno de los mejores marcadores bioquímicos candidatos para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del proceso de la OA. Una mayor expresión en la membrana sinovial reumatoide, además, el tejido lesionado comúnmente presente en las articulaciones degeneradas, puede contribuir significativamente al aumento de sus niveles en el líquido sinovial. Su aumento puede reflejar una mayor destrucción de la matriz dentro de la articulación patológica, con una mayor liberación de CHI3L1 de la matriz del cartílago al líquido sinovial. Esto puede sugerir que el aumento de la síntesis por las células sinoviales conduce a una mayor proliferación de esta población celular, que es una característica típica de la sinoviopatía osteoartrotica. (T Knorr, 2003). Existe una relación en la expresión de CHI3L1 de los resultados obtenidos con la literatura, ya que muestran un aumento en su expresión al comienzo de la enfermedad, lo cual se puede considerar como uno de los biomarcadores potencialmente a utilizar en el estudio y tratamiento de la OA. Por ello el aumento de sus niveles en el líquido sinovial artrotico, puede reflejar su expresión por otras células del tejido conectivo presentes dentro de las articulaciones, como fibroblastos sinoviales activados o sinoviocitos.

La última proteína a considerar que presenta un comportamiento de tipo ondulante es la cistatina-C (CysC) ya que en las etapas tempranas y avanzadas de la enfermedad presenta un aumento en su expresión y en un grado intermedio (grado II) presenta un comportamiento similar al grupo control. La sobreexpresión de cysC en la membrana tiene poco efecto sobre la

inflamación sinovial, pero se ha demostrado que los niveles elevados de expresión de cathepsina K (catK) puede aumentar la sinovitis, la formación de osteofitos o esclerosis ósea debido a la sobreexpresión de cysC en la membrana sinovial (Sirkka Kyostio-Moore, 2015). El comportamiento de la cysC resulta con dificultad a considerarse, ya que existen diferentes grados expresión con respecto a cada grado de la enfermedad lo cual existe poca similitud con lo que se encuentra escrito en distintas investigaciones.

La disminución del agregano, PRDX5 y colágeno alfa 1 y el aumento de la quitinasa en la OA coincide con diferentes estudios publicados asociados con la artrosis, lo cual podemos corroborar que dichas proteínas necesitarían ser objetos en futuros estudios para continuar analizando su comportamiento. Por lo tanto, la identificación de biomarcadores precoces en la OA ayudará al diagnóstico o desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas.

8. Conclusión

En este trabajo se ha llevado a cabo un análisis proteómico utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en muestras de líquido sinovial de pacientes con diferentes grados de artrosis (OA) frente a donantes sanos. Se ha realizado una cuantificación relativa de proteínas utilizando marcaje libre y se han analizado los datos utilizando el software PEAKS. De las proteínas cuantificadas, 3 de ellas tuvieron un comportamiento diferencial constante en los grados de la artrosis (grado I al grado IV) comparadas con donantes sanos. El agregano y la Peroxiredoxin-5 mitochondrial se encontraron disminuidas y la quitinasa aumentada en pacientes con OA encontrando resultados similares en estudios previamente descritos. Para que estos posibles biomarcadores puedan ser utilizados en el diagnóstico, pronóstico y evaluación terapéutica de la OA es necesario realizar etapas de validación en cohortes con mayor número de muestras y realizando técnicas de proteómica dirigida, basadas en espectrometría de masas o inmunoensayos.

9. Bibliografía

1. Acebes-Cachafeiro JC, Calvo-Crespo E, Guerrero-López R, Herrero-Beaumont G. Biomarcadores en la artrosis: utilidad de la proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa (COMP) y de los glucosaminoglicanos sulfatados (sGAG) en la valoración del cartílago articular. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. 2004;48(5):398–403.
2. Balakrishnan L, Nirujogi RS, Ahmad S, Bhattacharjee M, Manda SS, Renuse S, et al. Proteomic analysis of human osteoarthritis synovial fluid. *Clin Proteomics*. 2014;11(1):6.
3. Boffa A, Merli G, Andriolo L, Lattermann C, Salzman GM, Filardo G. Synovial fluid biomarkers in knee osteoarthritis: A systematic review and quantitative evaluation using BIPEDs criteria. *Cartilage*. 2020;1947603520942941.
4. Collins JA, Wood ST, Nelson KJ, Rowe MA, Carlson CS, Chubinskaya S, et al. Oxidative stress promotes peroxiredoxin hyperoxidation and attenuates pro-survival signaling in aging chondrocytes. *J Biol Chem*. 2016;291(13):6641–54.
5. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*. 2008;26(12):1367–72.
6. Curso de Biotecnología Aplicada 7a Edición [Internet]. Calameo.com.
7. De Simoni S, Linard D, Hermans E, Knoop B, Goemaere J. Mitochondrial peroxiredoxin-5 as potential modulator of mitochondria-ER crosstalk in MPP+-induced cell death. *J Neurochem*. 2013;125(3):473–85.
8. Fernandez-Puente P, Ruiz-Romero C, Blanco FJ. Discovery of biomarkers for osteoarthritis using proteomics technologies [Book]. Smgebooks
9. González AOL, González MAA, Oliva GJC, Quintana RG, Gravié AS, Gil HRL. Uso de plasma rico en factores de crecimiento en pacientes con osteoarthritis de rodilla. *Acta Médica del Centro*. 2018;12(2):130–9.
10. Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. Structure and function of aggrecan. *Cell Res*. 2002;12(1):19–32.
11. Knoop B, Goemaere J, Van der Eecken V, Declercq J-P. Peroxiredoxin 5: structure, mechanism, and function of the mammalian atypical 2-Cys peroxiredoxin. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(3):817–29.
12. Knorr T, Obermayr F, Bartnik E, Zien A, Aigner T. YKL-39 (chitinase 3-like protein 2), but not YKL-40 (chitinase 3-like protein 1), is up regulated in osteoarthritic chondrocytes. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(10):995–8.
13. Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(8):1233–41.
14. Kyostio-Moore S, Piraino S, Berthelette P, Moran N, Serriello J, Bendele A, et al. Overexpression of cystatin C in synovium does not reduce synovitis or cartilage degradation in established osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):5.

15. Liao W, Li Z, Li T, Zhang Q, Zhang H, Wang X. Proteomic analysis of synovial fluid in osteoarthritis using SWATH-mass spectrometry. *Mol Med Rep.* 2018;17(2):2827–36.
16. Liu Y, Lin L, Zou R, Wen C, Wang Z, Lin F. MSC-derived exosomes promote proliferation and inhibit apoptosis of chondrocytes via lncRNA-KLF3-AS1/miR-206/GIT1 axis in osteoarthritis. *Cell Cycle.* 2018;17(21–22):2411–22.
17. Mahendran SM, Oikonomopoulou K, Diamandis EP, Chandran V. Synovial fluid proteomics in the pursuit of arthritis mediators: An evolving field of novel biomarker discovery. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2017;54(7–8):495–505.
18. Martínez Figueroa R, Martínez Figueroa C, Calvo Rodríguez R, Figueroa Poblete D. Osteoarthritis (artrosis) de rodilla. *Rev chil ortop traumatol.* 2015;56(3):45–51.
19. Mateos J, Lourido L, Fernández-Puente P, Calamia V, Fernández-López C, Oreiro N, et al. Differential protein profiling of synovial fluid from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients using LC-MALDI TOF/TOF. *J Proteomics.* 2012;75(10):2869–78.
20. Mauricio WE. Cirugía biológica pre protésica en artrosis temprana de rodilla. *Rev médica Clín Las Condes.* 2014;25(5):793–804.
21. Nguyen LT, Sharma AR, Chakraborty C, Saibaba B, Ahn M-E, Lee S-S. Review of prospects of biological fluid biomarkers in osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(3):601.
22. Peffers MJ, Smagul A, Anderson JR. Proteomic analysis of synovial fluid: current and potential uses to improve clinical outcomes. *Expert Rev Proteomics.* 2019;16(4):287–302.
23. Poole AR, Kobayashi M, Yasuda T, Lavery S, Mwale F, Kojima T, et al. Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(Supplement 2):78ii–81.
24. Roughley PJ, Mort JS. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *J Exp Orthop.* 2014;1(1):8.
25. Ruiz-Romero C, Fernández-Puente P, Blanco FJ. Biomarkers in Osteoarthritis: Value of Proteomics. In: *Biomarkers in Bone Disease.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2016. p. 1–17.
26. Ruiz-Romero C, Fernández-Puente P, Calamia V, Blanco FJ. Lessons from the proteomic study of osteoarthritis. *Expert Rev Proteomics.* 2015;12(4):433–43.
27. Saberi Hosnijeh F, Bierma-Zeinstra SM, Bay-Jensen AC. Osteoarthritis year in review 2018: biomarkers (biochemical markers). *Osteoarthritis Cartilage.* 2019;27(3):412–23.
28. Salomon J, Matusiak Ł, Nowicka-Suszek D, Szepietowski JC. Chitinase-3-like protein 1 (YKL-40) is a new biomarker of inflammation in psoriasis. *Mediators Inflamm.* 2017;1–4.
29. Sun Y, Wang F, Sun X, Wang X, Zhang L, Li Y. CX3CR1 regulates osteoarthrosis chondrocyte proliferation and apoptosis via Wnt/ β -catenin signaling. *Biomed Pharmacother.* 2017;96:1317–23.
30. Team, PEAKS. *PEAKS 8.5 User Manual.* PEAKS team, 2017.

31. Tío L, Orellana C, Pérez-García S, Piqueras L, Escudero P, Juarranz Y, et al. Efecto del condroitín sulfato en la sinovitis de pacientes con artrosis de rodilla. *Med Clin (Barc)*. 2017;149(1):9–16.
32. Tobías Mojica Ph.D., Oscar Sánchez y Leonardo Bobadilla. "La Proteómica, otra cara de la genómica." *Nova* , 2003: 13 - 16.
33. Torres Courchoud I, Pérez Calvo JI. Biomarcadores y práctica clínica. *An Sist Sanit Navar*. 2016;39(1):5–8.
34. Walbrecq G, Wang B, Becker S, Hannotiau A, Fransen M, Knoop B. Antioxidant cytoprotection by peroxisomal peroxiredoxin-5. *Radic Biol Med*. 2015;84:215–26.
35. Zhang D, Johnson LJ, Hsu H-P, Spector M. Cartilaginous deposits in subchondral bone in regions of exposed bone in osteoarthritis of the human knee: histomorphometric study of PRG4 distribution in osteoarthritic cartilage. *J Orthop Res*. 2007;25(7):873–83.
36. Zhao T, Su Z, Li Y, Zhang X, You Q. Chitinase-3 like-protein-1 function and its role in diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):201.